

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-297121

(43)公開日 平成9年(1997)11月18日

(50)Int.Cl. ¹	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327			G 0 1 N 27/30	3 5 3 T
27/416			33/92	B
33/92			27/30	3 5 3 J
			27/46	3 3 6 G

審査請求 未請求 前求項の数 8 O L (全 10 頁)

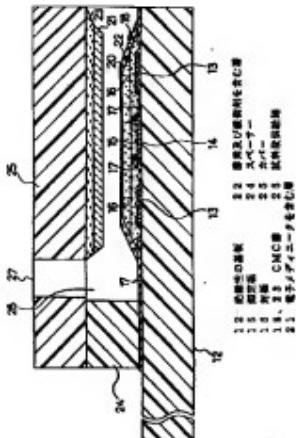
(21)出願番号 特願平8-341001	(71)出願人 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
(22)出願日 平成8年(1996)12月20日	(72)発明者 山本 智浩 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
(31)優先権主張番号 特願平8-49533	(72)発明者 池田 信 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
(32)優先日 平8(1996)3月7日	(72)発明者 吉岡 俊彦 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
(33)優先権主張国 日本 (JP)	(74)代理人 弁理士 東島 隆治 (外1名) 最終頁に続く

(54)【発明の名稱】コレステロールセンサ

(57)【要約】

【課題】 血液中のコレステロール濃度を短時間で、高精度な測定ができるセンサを提供することを目的とする。

【解決手段】 絶縁性の基板、基板上に設けられた測定部および対極を含む電極系、基板上に配置されて基板との間に基板端部から前記電極系への試料液供給路を形成する溝を有するカバーパート材、および前記試料液供給路に露出する部分に設けられた反応試薬系を含む反応層を具備し、前記反応試薬系中に少なくともコレステロールデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニニジスクレオチド、および電子メディエーターを含むコレステロールセンサ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 測定値と対値を有する電極系、および反応試験系を具備し、前記反応試験系中に少なくともコレステロールデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニンジスクレオチド、および電子メディエーターを含むことを特徴とするコレステロールセンサ。

【請求項2】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定値および対値を含む電極系、前記基板上に配された基板との間に基板端部から前記電極系への試料液供給路を形成する溝を有するカバー部材、および前記試料液供給路に露出する部分に設けられた反応試験系を含む反応層を具備し、前記反応試験系中に少なくともコレステロールデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニンジスクレオチド、および電子メディエーターを含むことを特徴とするコレステロールセンサ。

【請求項3】 電子メディエーターが、フェリシアノ化物、1、2-ナフトキノン-4-スルホニル、2、6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノン、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、オナニン、フェナジンメトサルフェート、およびメルドラブルーからなる群より選択される少なくとも一種である請求項1または2に記載のコレステロールセンサ。

【請求項4】 前記反応試験系中にジアホラーゼを含む請求項1または2に記載のコレステロールセンサ。

【請求項5】 前記反応試験系中にコレステロールエステラーゼおよび界面活性剤を含む請求項1または2に記載のコレステロールセンサ。

【請求項6】 前記反応層、前記電極系上およびカバ一部材間に分割して設けられている請求項2に記載のコレステロールセンサ。

【請求項7】 前記反応層中の少なくとも一部に親水性高分子を含む層を有する請求項2または6に記載のコレステロールセンサ。

【請求項8】 前記反応層中の少なくとも一部に親水性高分子と電子メディエーターが混合された層を有する請求項2または6に記載のコレステロールセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料中のコレステロールについて、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施することができるコレステロールセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や操作などをを行うことなく簡便に定量する方式として、様々なバイオセンサが開発されている。バイオセンサの一例として、まずグルコースセンサを説明する。酵素電極を用いたグルコースの定量方法としては、グルコースオキシダーゼと酵素電極あるいは過酸化水素

電極と組み合わせた方式が一般に知られている。グルコースオキシダーゼは、酵素を電子メディエーターとして基質であるβ-D-グルコースをD-グルコノ-β-ラクトンに選択的に酸化する。この反応にともない、酵素は過酸化水素に還元される。このときの酵素消費量を酵素電極によって測定するか、もしくは過酸化水素の生成量を白金電極等を用いた過酸化水素電極によって測定することによりグルコースの定量が行われる。

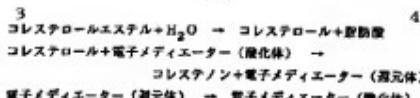
【0003】 しかし、上記の方法では、酵素のない条件下では測定が不可能である。そこで、酵素を電子メディエーターとして用い、フェリシアノ化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の金属錯体や有機化合物を電子メディエーターとして用いるタイプのグルコースセンサが開発されている。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子メディエーターの還元体を電極で酸化することにより、その酸化電流からグルコース濃度が求められる。この手法は、グルコースに限らず他の基質の定量にも広く応用されている。

【0004】 この種のバイオセンサの一例として、次のようなグルコースセンサが知られている(特開平2-062952号公報)。すなわち、絶縁性の基板上にスクリーン印刷の方法で測定値、対値および参考値からなる電極系を形成し、この電極系上に、電極系に接して反応試験系として、親水性高分子と酸化還元酵素と電子メディエーター、必要に応じて加えた緩衝剤を含む反応層を形成したものである。基質を含む試料液を反応層上へ滴下すると、反応層が溶解し、緩衝剤の緩衝作用により最も高い酵素活性の得られるpHに調整され、酵素と基質が反応し、さらに電子メディエーターが還元される。酵素反応終了後、この還元された電子メディエーターを電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流から試料液中の基質濃度を求めるものである。

【0005】 このようなバイオセンサは、測定対象物質を基質とする酵素を用いて、様々な物質に対する測定が原理的に可能である。酸化還元酵素にコレステロールオキシダーゼを用いれば、血清中のコレステロールを測定するバイオセンサを構成することができる。しかし、診断指標として用いられる血清コレステロール値は、コレステロールと、コレステロールエストラの濃度を合計したものである。コレステロールエストラはコレステロールオキシダーゼによる酸化反応の基質になることができないため、診断指標としての血清コレステロール値を測定するためには、コレステロールエストラをコレステロールに変化させる過程が必要である。この過程を触媒する酵素として、コレステロールエストラーゼが知られている。そこで、現在使用されている方法は、次の一般反応式に基づいて行われる。

【0006】

【化1】



【0007】

【発明が解決しようとする課題】ところが上に示したような、コレステロールオキシゲナーゼによってコレステロールを酸化させる反応において、酸素以外の化合物を電子メディエーターとして用いた場合、酸素と酸素間の二次反応速度が電子メディエーターと酸素間の二次反応速度に比べて大きいために、試料液中に酸素が溶存した場合、電極から得られる電子メディエーターの酸化電流値は、試料液中の基質の酸化反応がすべて電子メディエーターの還元反応と共役した場合に得られると予想される数値より低くなる傾向にあった。このため、特に試料液中の基質濃度が低いときの応答が正確ではない場合があるという問題を有していた。また、反応に要する時間が長くなるという問題もあり、これを避けるためにコレステロールオキシゲナーゼの相持量を増加させると、製造コストの増加を招き、また、センサに担持される試薬量の増加は、センサの構成を物理的に困難にするという問題があった。

【0008】本発明は、このような問題点を解決するもので、高選択性・高精度を定量可能なコレステロールセンサを提供することを目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】この目的を達成するため本発明のコレステロールセンサは、測定部と対極を有する電極系、および反応試薬系を具備し、反応試薬系に少なくともコレステロールデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニジンジクレオチド、および電子メディエーターを含む構成を有する。この構成により、酸素の影響を受けることなく、迅速にコレステロール濃度を測定できるバイオセンサを得ることができる。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明のコレステロールセンサは、上記の反応試薬を溶液とし、この溶液中に電極系を浸没する構成とすることができるが、反応試薬を乾燥状態で電極系上またはその近傍に配置した構成とすることにより、安価に作製することができ、かつ使用が簡便なコレステロールセンサを得ることができる。すなわち、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定部および対極を含む電極系、並びに前記基板上に配置されて基板との間に前記基板部から前記電極系への試料液供給路を形成する溝を有するカバー部材によりセンサ本体を構成し、前記試料液供給路に露出する部分に反応試薬系を含む反応層を形成するのである。

【0011】このような構成のコレステロールセンサについて、反応層の配置に關していくつかの好ましい形態を * 50

* 以下に説明する。第1の構成例は、基板の電極系上に反応層を有する。この反応層を形成するに際しては、電極系上にCMCのような親水性高分子の層を形成し、反応層の構成成分である酵素や電子メディエーターが電極系表面に直接接触するのを阻止するのが好ましい。これによって、電極系表面へのタンパク質の吸着や、フェリシアン化カリウムのような酸化能を有する物質の化学的作用による電極系の特性変化が起こり難くなる。

【0012】第2の構成例は、反応層が電極系上およびカバー部材間に分離して形成されている。特に、反応試薬として、高いpH下で比較的不安定な1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのような電子メディエーターとトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタノン塩酸(以下、Tris塩酸塩と略す)緩衝剤のような緩衝剤を含む場合は、両者を分離して配置するのが好ましい。例えば、カバー部材の試料液供給路に露出する部分に1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのような電子メディエーターの層を形成し、基板の電極系上にはTris塩酸塩のような緩衝剤を含む反応層を形成する。

【0013】第3の構成例は、1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのような電子メディエーターとTris塩酸塩のような緩衝剤が同じ基板上に分離して形成されている。例えば、電極系上に前記緩衝剤を含む反応層が形成され、この反応層よりも試料液供給路の開口部間に1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのような電子メディエーターを含む層を設ける。後者の層の下地に親水性高分子の層を形成するか、またはそれらの層に親水性高分子を混合するのが好ましい。

【0014】第4の構成例は、基板上の電極系上には親水性高分子の層を有し、カバー部材の試料液供給路に露出する部分に反応層が形成されている。なお、第2および第3の構成例においても、電極系上は親水性高分子の層で被覆されているのが好ましい。また、第2および第3の構成例において、カバー部材間に電子メディエーターなどを含む層を形成する際は、その下地に親水性高分子の層を形成するか、またはそれらの層に親水性高分子を混合するのが好ましい。また、上記の反応層またはその近傍にレシチンの層を設けて、電極系への試料液の導入を円滑にすることが好ましい。

【0015】本発明において、好ましい電子メディエーターとしては、フェリシアン化物、1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノン、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブル

一、ガロシアニン、チオニン、フェナジメントサルフェート、およびメルドブルーからなる群より選択される少なくとも一種である。また、反応試験系中にジアホラーゼを含むことが好ましい。ジアホラーゼは、電子メディエーターとニコチンアミドアデニジヌクレオチドの還元体との結合を触媒し、測定時間の短縮に役立つ。

1, 2-ナフタキノン-4-スルホン酸カリウムのように、ジアホラーゼの触媒作用なしでも、ニコチンアミドアデニジヌクレオチドの還元体と非常に速い酸化還元反応を行う電子メディエーターを用いる場合は、ジアホラーゼは特に必要としない。反応試験系中にコレステロールエステラーゼおよび界面活性剤を含むことが好ましい。

【0016】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明する。

【実施例1】図1は本実施例のコレステロールセンサを示している。1はガラスセルであり、内に搅拌子2を入れ、スクランマシン3上に固定されている。ガラスセル1には、電極固定器具3により、測定板4、対極5、および参照板6がセットされている。測定板4はグラッシャーカーボン電極で、また対極5は白金線でそれぞれ構成されている。参照板6は銀/塩化銀電極で構成され、アガロースグルムにKCl 1M溶液を浸透させた脂層を介してガラスセルに接続されている。これらの電極は、それぞれ定電位記録装置7を介して、記録装置10に接続されている。以上の各要素から測定装置が構成されている。

【0017】前記ガラスセル1中には、反応液7が満たされており、反応液7は搅拌子2によって搅拌される。反応液7は、コレステロールデグロダーゼ(以下、ChDHと略す)、ニコチンアミドアデニジヌクレオチド(以下NADと略す)、電子メディエーターとしてのフェリシアン化カリウム、およびジアホラーゼを含むTris塩酸塩の緩衝水溶液である。各反応系の望ましい濃度は以下のとおりである。

ChDH = 10ユニット/m¹、NAD = 2.5mM/m¹、ジアホラーゼ = 2.0ユニット/m¹、フェリシアン化カリウム = 1.00mM/m¹、Tris塩酸塩 = 0.3M¹/m¹。

ここにあげた濃度であることが望ましいが、必要に応じ、使用条件により、一部異なる濃度を用いても、適切な結果を得ることができる。pHは8.0から9.0の範囲内であることが望ましい。pHが8.0より低いと反応所用時間が著しく増加し、またpH 9.0以上では、コレステロールの単位濃度あたりに対する電流値が小さくなり、逆に非酵素的な化学反応によると考えられる残余電流値が増大する。

【0018】上記の測定板4には、参照板6に対して50.0mVの電位が印加されている。コレステロールを含む試料液を電極固定器具3の貫通孔11より反応液7

中に滴下すると、ChDHによりコレステロールが酸化されてコレステノンになり、この反応を共役して、NADが還元され、その還元体であるNADHが生成される。生成したNADHは、フェリシアン化物イオンとの間に電子の授受を行い、酸化体であるNADに戻る。フェリシアン化物イオンは、NADHから電子を受け取り、フェロシアン化物イオンに還元される。このようにして生成されるフェロシアン化物イオンの濃度は、試料液中のコレステロール濃度に比例する。この酸化還元反応はジアホラーゼにより触媒される。ジアホラーゼを含むことにより自動的に反応が進行するが、ジアホラーゼの存在により非常に速く反応が進行させることができる。

【0019】前述したように、測定板4には参照板6に對して50.0mVの電位が印加されているため、フェリシアン化物イオンは測定板4に電子を渡し、フェリシアン化物イオンに戻る。なお、測定板4がグラッシャーカーボン電極で、測定板4近傍の電位が、銀/塩化銀電極に對して50.0mVなので、NADHが測定板4において電気化学的に酸化される量はきわめて少ないと考えられる。測定板4で受け取った電子の移動を電流として観察することにより、試料液中のコレステロール濃度を定量することができる。試料液が血清のようにコレステロールエステルを含む場合には、反応液7中に前記成分の他に、さらにコレステロールエステラーゼ、およびコレステロールエステラーゼの触媒性を促進させるための界面活性剤を添加することにより、コレステロールエステルとコレステロールの濃度の総和を測定することができる。

【0020】本実施例の測定例を図2、および図3に示す。図2は、電流値の経時変化を記録装置10により記録したものであり、図3は、図2の電流値とコレステロール濃度の関係を示したグラフである。これらに示すように、コレステロールの液面下に伴い電流値が増加し、1分以内に定常値に達し、電流値とコレステロール濃度は非常に良好な直線関係を示した。

【0021】【実施例2】図4は本実施例のコレステロールセンサのうちカバーおよびスペーサーを除いた縦断面図であり、図5は反応層を除いたコレステロールセンサの分解図である。1/2はポリエチレンテレフタレー40トからなる絶縁性の基板を示す。この基板1/2上には、スクリーン印刷により銀ベーストを印刷してリード13、14を形成してある。基板1/2上には、さらに樹脂バインダーを含む導電性カーボンベーストを印刷することにより、測定板15と対板16を含む電極系、および絶縁性ベーストを印刷することにより絶縁層17をそれぞれ形成してある。絶縁層17は、測定板15および対板16の露出部分の面積を一定とし、かつリードを部分的に覆っている。

【0022】このようにして電極部分を作製した後、電極系上に、親水性高分子カルボキシメチルセルロースの

ナトリウム塩(以下CMCと略す)の0.5wt%水溶液を滴下し、50°Cの風温乾燥器中で10分間乾燥させ、CMC層18を形成した。ついで、ノカルジア由来のChDHを10ユニット/m1、酵素であるNADを50mM/1、ショードモナス由來の酵素ジアホラーゼを10ユニット/m1、電子メディエーターであるフェリシアン化カリウムを50mM/1、ショードモナス由來のコレステロールエステラーゼ(以下ChEと略す)を1kユニット/m1、界面活性剤であるn-オクチル-β-D-チオグロコシドを0.5wt%、および緩衝剤であるTris塩酸塩0.3M/1を含む混合水溶液を、pH8.5に調整した。この水溶液をCMC層18上に5μl1ずつ滴下し、常温乾燥空気中で30分間乾燥させることにより、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19を形成した。

【0023】この場合、CMCとChDH、ChE、フェリシアン化カリウム、n-オクチル-β-D-チオグロコシド、NAD、および緩衝剤は、部分的に混合された状態で厚さ数ミクロンの薄層状となっている。すなわち、CMC層上に前記水溶液を滴下すると、最初に形成したCMC層は一度溶解し、その後の乾燥過程で酵素などを混合された形で層を形成する。しかし、操作等をともなわないため完全な混合状態とはならず、電極系表面はCMCのみによって被覆された状態となる。このため、酵素および電子メディエーターなどが電極系表面に接触しないから、電極系表面へのタンパク質の吸着や、フェリシアン化カリウムのような酸化剤を有する物質の化学的作用による電極系の特性変化が起こり難くなる。その結果、高精度なセンサ応答を有するセンサ得ることができる。このChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19の上に、ホスファチジルコリンの0.5wt%ルエン溶液を5μl滴下して乾燥させ、レシチン層20を形成した。このレシチン層を設けることにより、試料溶液の導入が円滑に行われる。このレシチン層は、酵素反応には必須ではない。

【0024】上記のようにしてCMC層18、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19、およびレシチン層20からなる反応層を形成した後、カバー25およびスペーサー24を図4中、一点頭線で示すような位置関係をもって接着することにより、コレステロールセンサが完成する。こうして組み立てられたセンサは、スペーサー24のスリット26の部分に試料液供給路28が形成される。このコレステロールセンサは、試料液をセンサ先端の試料液供給路28の開口部に接触させるだけの簡単操作で、試料液は容易に反応層部分へ導入される。試料液の供給量は、試料液供給路28の容積に依存するため、あらかじめ定量する必要はない。さらに、測定中の

試料液の蒸発を最小限に抑えることができ、精度の高い測定が可能となる。なお、図4中、27はカバー25に設けた空気孔である。ここで、カバー25およびスペーザー24に透明な高分子材料を用いると、反応層の状態や試料液の導入状況を外側から容易に観察することができる。

【0025】こうして作製したコレステロールセンサに、試料液としてコレステロール標準液5μlを試料液供給路の開口部より供給し、3分後に対振子を基準にして測定値にノード方向へ+0.5Vのパルス電圧を印加し、5秒後の電流値を測定した。試料液が反応層へ到達すると、レシチン層20を溶解し、引抜きChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19を溶解した。試料液中のコレステロールエステルは、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19中のn-オクチル-β-D-チオグロコシドにより再分散され、ChEの触媒作用によりコレステロールになり、コレステロールはChDHによって酸化され、この酸化反応と共にNADが還元され、NADHが生じ、NADHはジアホラーゼの触媒作用により、再び酸化されてNADに戻る。このNADHの酸化反応と共にフェリシアン化物イオンがフェロシアン化物イオンに還元される。次に、上記のパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化物イオンおよび一部NADHの酸化電流が得られ、この電流値は基準であるコレステロールの濃度に対応する。なお、測定される電流値には、一部NADHの酸化電流が含まれている可能性があるが、反応試験系へのジアホラーゼの添加により、測定用時間が短縮されることから、NADHの測定値上の電気化学的な酸化が測定値に占める割合は、きわめて低いと思われる。

【0026】【実施例3】実施例2と同様に、基板上の電極系上にCMC層18を形成した。次に、スペーサー24とカバー25を組み合わせることにより、スリット26の部分に形成される凹部にもCMCの0.5wt%水溶液を滴下し、乾燥させてCMC層23を形成した。このCMC層23を覆うようにして、電子メディエーターである1,2-ナフチキノン-4-スルホン酸カリウム(以下NQSと略す)の50mM溶液を5μl滴下し、常温空気中で乾燥させ、NQS層21を形成した。スペーサー24とカバー25を組合せたカバー部材間に上部反応層を形成する場合、このCMC層23がないと、反応層が剥離し易くなるので、CMC層23を設けるのが好ましい。CMC層23とNQS層21を設けるかわりに、CMC水溶液にNQSを溶解した溶液を滴下して、CMCとNQSの両者を含む層を設けることもできる。NQSは、高いpH下で比較的不安定なので、Tris塩酸塩のような緩衝剤を含む溶液に溶解して、長時間放置することができないが、このように緩衝剤と分

離することにより、センサ中に電子メディエーターとして組み入れることができる。

【0027】次に、ノカルジア由来のChDHを1.0ユニット/m¹、補酵素であるNADを5.0mM、ショードモナス由来のChEを1.0ユニット/m¹、界面活性剤であるn-オクチル-B-D-チオグルコシドを0.5w.t%、および緩衝剤であるTris塩酸塩0.3Mを含む混合水溶液をpH8.5に調整した。この水溶液を電極系上のCMC層18上に5μlずつ滴下し、常温乾燥空気器中で30分間乾燥させることにより、ChDH-ChE-界面活性剤-NAD-緩衝剤層22を形成した。NQSのよう、ジアホラーゼの触媒作用なしでも、NADHと共に速い酸化還元反応を行う電子メディエーターを用いる場合は、本実施例のように、ジアホラーゼを省略できる。測定時間は更に短縮する必要がある場合は、本実施例の構成に、ジアホラーゼを加えることもできる。このChDH-ChE-界面活性剤-NAD-緩衝剤層22の上層に実施例2と同様にホスマチジルコリンの0.5wt%トルエン溶液を5μl滴下し、乾燥させてレシチン層20を形成した。以上のようにしてコレステロールセンサの下層反応層が形成される。

【0028】上記の上部反応層を形成したスペーサーとカバーの組合せと、下部反応層を形成した絶縁性基板を組み合わせることによりコレステロールセンサが完成する。このようにして得られたコレステロールセンサの構造を図6に示す。このようにして作製したコレステロールセンサによって得られたコレステロール標準溶液に対する応答は、コレステロール濃度に対して直線性を示した。

【0029】《実験例4》図7は本実施例のコレステロールセンサの断面図である。まず、実施例2と同様にして基板上の電極系上にCMC層18を形成した。さらに、このCMC層18と試料液供給路28の開口部に相当する基板先端部との間に、電極部を配置しない位置に前記CMC層18に接觸しないように、CMC層18と同様にしてCMC層29を形成した。このCMC層29とCMC層18は、同じものである必要はない。ついで、ノカルジア由来のChDHを1.0ユニット/m¹、補酵素であるNADを5.0mM、ショードモナス由来の酵素ジアホラーゼを1.0ユニット/m¹、電子メディエーターであるフェリシアノ化カリウムを5.0mM、ショードモナス由来のChEを1.0ユニット/m¹、界面活性剤であるn-オクチル-B-D-チオグルコシドを0.5wt%、および緩衝剤であるTris塩酸塩0.3Mを含む混合水溶液をpH8.5に調整した。この混合水溶液5μlをCMC層29を覆うように滴下し、常温乾燥空気器中で30分間乾燥させることにより、ChDH-ChE-フェリシアノ化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19を形成した。

ジアホラーゼ層19を形成した。

【0030】さらに、CMC層29を覆うようにして、電子メディエーターであるNQSの5.0mM溶液を5μl滴下し、常温空気中で乾燥させ、NQS層21を形成した。CMC層29とNQS層21を設けるかわりに、CMC水溶液にNQSを溶解した溶液を滴下して、CMCとNQSを含む層を設けることもできる。NQSは、高いpH下で比較的不安定なので、Tris塩酸塩のような緩衝剤を含む溶液に溶解して、長時間放置することができないが、このように緩衝剤を分離することにより、センサ中に電子メディエーターとして組み入れることができる。NQS層21を形成するために前記NQS溶液をCMC層29上に滴下する際、NQS溶液をChDH-ChE-フェリシアノ化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19に接触しないようにする必要がある。

このChDH-ChE-フェリシアノ化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19およびNQS層21の上に、ホスマチジルコリンの0.5wt%トルエン溶液を5μl滴下し乾燥させてレシチン層20を形成した。このレシチン層を設けることで、試料液の導入が円滑に行われるが、レシチン層は酵素反応には必須ではない。また、レシチン層20は、スペーサー24とカバー25を組み合わせたカバー部材側の凹部、すなわち試料液供給路に露出する面に形成してもよい。

【0031】上記のようにしてCMC層18、CMC層29、ChDH-ChE-フェリシアノ化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19、NQS層21、レシチン層20からなる反応層を形成した後、カバー25をお上げスペーサー24を図4中、一点鋼線で示すような位置関係をもって接着することにより、コレステロールセンサが完成する。

【0032】《実験例5》実験例2と同様にして基板上の電極系上にCMCの0.5wt%水溶液を滴下し、乾燥させてCMC層18を形成した。次に、実験例3と同じ様にして、スペーサー24とカバー25を組み合わせたカバー部材側の凹部にCMCの0.5wt%水溶液を滴下し、乾燥させてCMC層23を形成した。ついで、ChDHを1.0ユニット/m¹、NADを5.0mM、ジアホラーゼを1.0ユニット/m¹、電子メディエーターであるフェリシアノ化カリウムを5.0mM、ショードモナス由来のChEを1.0ユニット/m¹、界面活性剤であるn-オクチル-B-D-チオグルコシドを0.5wt%、および緩衝剤であるTris塩酸塩0.3Mを含む混合水溶液をpH8.5に調整した。この混合水溶液5μlをCMC層23を覆うように滴下し、常温乾燥空気器中で30分間乾燥させることにより、ChDH-ChE-フェリシアノ化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19を形成した。

【0033】このようにして反応層を形成したスペーサー

—24とカバー25からなるカバーパート材を前記の基板に接着することによりコレステロールセンサが完成する。

このように、電極部と離れて反応層を設け、電極表面にはCMC層のみを形成する方が、電極表面に反応層を設けるよりも、単位基質濃度あたりの電流値が高くなる。

【0034】なお、上記実施例に示した各試験の担持量は、実施の一例であり、本発明はこれらによって限定されるものではない。また、実施例2に示したレシチン層

20のように、本発明のコレステロールセンサには、反応層の表面に、試料溶液の反応試験系への導入を容易にするために脂質を含む層を設けることができる。この用途に用いる脂質として、上記の実施例に用いたホスファチジルコリンの他、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質などの両親媒性脂質を用いることができる。さらに、反応層を形成するための親水性高分子としては、上記の実施例に用いたカルボキシメチルセルロース、ポリビニルビロドリンの他、ポリビニルアルコール、水溶性セルロース誘導体、特にエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース；ゼラチン、ポリアクリル酸およびその塩、デンプンおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩、ポリアクリルアミド、メタクリレート樹脂、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレートなどを用いることができる。

【0035】また、上記実施例中ではChEとしてショードモナス類由来のものを用い、界面活性剤として、n-オクチル- β -D-オーグルコシドを用いているが、

ショードモナス類由来のChEを用いる場合、Lubr o-IPX、コール酸ナトリウム、デシル- β -マルトシド、DK-エヌステルを用いても良好な応答を示す。また、ChEとしては、は乳酸脱氫酶のものを用いること也可能で、この場合、コール酸ナトリウムなどの、刷毛状常剤を持つ界面活性剤を用いることで、非常に良好な応答性を示す。また、上記の実施例2～5では、測定値と対照のみの二液電極系について述べたが、参考値を加えた三電極方式にすれば、より正確な測定が可能である。

【0036】

【発明の効果】以上のように本発明によれば、酵素の影響を受けることなく、より短い時間で試料液中のコレステロール濃度を測定できるコレステロールセンサが得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるコレステロールセンサの構成を示す図である。

【図2】同コレステロールセンサによる測定結果の例を示す図である。

【図3】同コレステロールセンサの測定例におけるコレステロール濃度と電流値の関係を示す図である。

【図4】本発明の他の実施例におけるコレステロールセンサの要部の構造を示す断面図である。

【図5】同コレステロールセンサの反応層を除いた分解構造である。

【図6】本発明のさらに他の実施例におけるコレステロールセンサの要部の構成を示す断面図である。

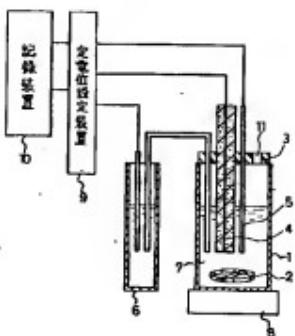
【図7】本発明のさらに他の実施例におけるコレステロールセンサの要部の構成を示す断面図である。

【図8】本発明のさらに他の実施例におけるコレステロールセンサの要部の構成を示す断面図である。

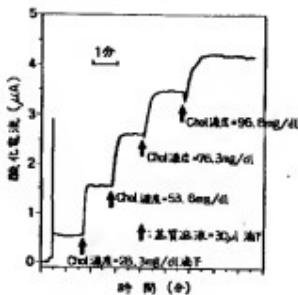
【符号の説明】

- 1 ガラスセル
- 2 接触子
- 3 電極固定器具
- 4 測定値
- 5 対板
- 6 参照板
- 7 反応溶液
- 8 スターラーマシン
- 9 定電位設定装置
- 10 記録装置
- 11 貨通孔
- 12 絶縁性的基板
- 13、14 リード
- 15 測定値
- 16 対板
- 17 純粋層
- 18 CMC層
- 19 ChDH-ChE-フェリシア化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層
- 20 レシチン層
- 21 NQS層
- 22 ChDH-ChE-界面活性剤-NAD-緩衝剤層
- 23 CMC層
- 24 スペーサー
- 25 カバー
- 26 スリット
- 27 空気孔
- 28 試料液供給路

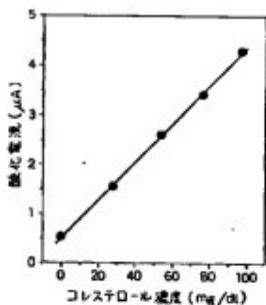
【圖 1】



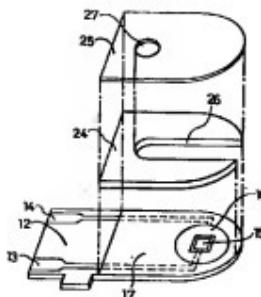
【図2】



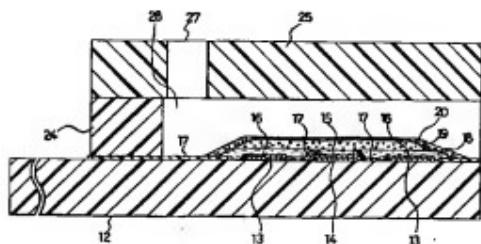
【四三】



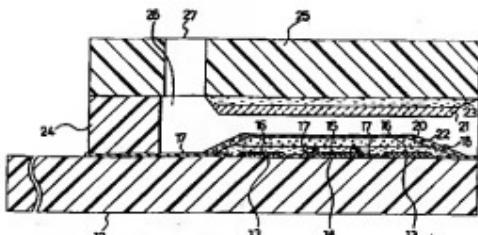
【四五】



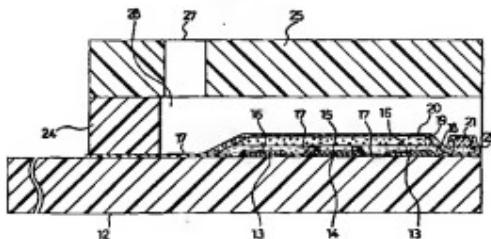
[M4]



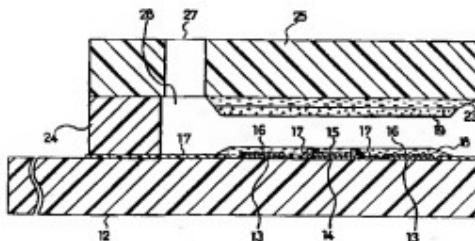
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 南海 史朗
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 岩田 潤子
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内